

# Trombin activity in plasma : a study on its formation and inhibition

Citation for published version (APA):

Xi, M. (1988). *Trombin activity in plasma : a study on its formation and inhibition*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19880701mx>

## Document status and date:

Published: 01/01/1988

## DOI:

[10.26481/dis.19880701mx](https://doi.org/10.26481/dis.19880701mx)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## 一般性讨论

本文的目的是从事血液凝固领域中的生物化学研究,所涉及的题目直接关系到临床医学问题,贯穿整个研究的主题是血浆凝血酶活性。在论文的前两章里,作者介绍了先天性单个凝血因子缺陷(A型和B型血友病)和口服抗凝剂引起的维生素K依赖凝血因子有效水平减低时血浆凝血酶生成的研究,从生理角度看,这些血浆凝固系统都是异常的。在这方面,这些研究与早期临床实验研究有关,因为临床凝血异常的发现经常先于相关凝血蛋白的发现。的确,当今大量有关血液凝血生理学知识大都是通过研究缺乏某种特别凝血蛋白的病人而积累的。现代与早期研究工作区别在于,由于测量和纯化凝血蛋白技术的进步,利用这些手段,现在可以探索那些早期研究者无法涉及的问题。在论文的后两章里,作者介绍了SJAMP(一种从海生黄瓜中提取的肝素样成份)的抗凝作用,目的是更深入的了解这种成份对血浆凝血酶活性的抑制。

自从Biggs和Nossel发现,当用稀释的凝血活酶触发血浆凝固时,血友病血浆不能生成正常量凝血酶(1),而后,Josso和Prou-Wartelle发现,因子Ⅶ是稀释的凝血活酶触发血浆凝固时血友病血浆促凝活性的基础(2),从而提示了经典的内源和外源凝血途径的内在联系,但是这种联系仍不能认识。在过去十年里,由于血液凝固生物化学的巨大发展,现在可以从血浆中分离和提纯所有已知的凝血蛋白并且可以把它们部分重组成血浆凝固系统。基于这种方法,Østerud和Rappaport在部分纯化的实验体系中证实,因子Ⅶ和凝血活酶的反应产物可以激活因子Ⅹ(3),但这条凝血途径的生理意义仍处于探讨阶段。近年来的体外研究显示,经因子Ⅶ—凝血活酶复合物激活因子Ⅹ进而因子Ⅹ激活因子Ⅺ的活化率大大低于因子Ⅶ—凝血活酶复合物直接激活因子Ⅹ(4-6)。因此,因子Ⅹ的凝血活酶依赖活化途径在体内凝血的重要性难以被接受。

在论文的第二章里,作者介绍了因子Ⅹ和因子Ⅶ对外源凝血过程中凝血酶生成的贡献。结果显示,当用于正常体外实验的凝血活酶触发血浆凝固时,因子Ⅹ缺陷血浆和用纯化因子Ⅹ重组的因子Ⅹ缺陷血浆的凝血酶生成率和生成量相同。在同样实验条件下,类似结果也见于纯化因子重组后的因子Ⅶ缺陷血浆。当用低浓度凝血活酶触发血浆凝固时,血浆凝血酶生成呈现出对因子Ⅹ和因子Ⅶ明显的依赖,维持正常凝血酶生成的因子Ⅹ和因子Ⅶ含量分别为30 nM(约40%凝固活性)和0.3 u/ml(约30%凝固活性)。这些结果清楚地展示,当少量凝血活酶存在时,因子Ⅹ和因子Ⅶ在血浆凝固中起着重要作用,两条经典凝血途径间关系的建立,可以适当地解释,为什么血友病内源凝血途径方面的异常不能够被其完整的外源凝血途径补偿。

维生素K依赖凝血蛋白的家族包括因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅹ和Ⅺ。维生素K的作用是促进这些蛋白太链氨基末端的谷氨酸残基的羧化反应,即使其转变成 $\gamma$ -羧基谷氨酸残基。这些残基对此类凝血蛋白通过钙离子桥结合带阴性电荷的磷脂表面是必需的。换言之,此类凝血因子参与凝血取决于与磷脂表面反应(7)。维生素K拮抗剂,如双香豆素衍生物,干扰维生素K依赖凝血因子的羧化过程,从而导致合成生物学上无活性而免疫学上可检出的形式。这些

无生物活性的凝血因子称为非氧化形式或者PIVKA (6—12)。

由于维生素K依赖凝血因子在体内的半衰期不同,口服维生素K拮抗剂时首先使因子Ⅱ活性减低,接着因子Ⅴ、Ⅹ和Ⅲ活性依次减低(12)。在治疗过程中,决定凝血酶原时间的因子Ⅱ,Ⅹ和Ⅲ活性在不同程度上同时减低,因此,从实验观测到的凝血酶原时间事实上反映着上述三个因子水平处于不同变化的总活性,而个体凝血因子与凝血酶原时间值的关系尚不清楚。例如,是否治疗初期因子Ⅱ活性水平减低代表体内有效抗血栓反应,或者当因子Ⅹ或因子Ⅲ活性水平减低时才能达到。

在论文的第三章里,作者介绍了双香豆素血浆中维生素K依赖因子在凝血酶原酶活性形成方面的相对重要性的研究。结果显示,于深度口服抗凝剂治疗病人血浆中加入纯化的因子Ⅱ、Ⅴ或Ⅹ并不影响凝血酶原酶的生成率和生成量,唯有存在于血浆中因子Ⅲ活性决定着凝血酶生成过程。进一步研究显示,当于因子Ⅱ、Ⅴ、Ⅹ和Ⅹ缺陷血浆中分别加入纯化的因子Ⅱ、Ⅴ、Ⅹ和Ⅹ时,血浆凝血酶原酶活性的生成率和生成量与加入的因子Ⅲ量呈线性增加,而达到最大量凝血酶原酶活性生成50%所需因子Ⅱ、Ⅴ和Ⅹ的量分别是<1%,5%和10%。结论认为,口服抗凝剂治疗时,唯有血浆因子Ⅲ活性水平变化反映着体内抗血栓反应。因此,以测量因子Ⅲ活性水平来监测口服抗凝剂治疗是合理的方法。

肝素用于临床实践长达40年之久,治疗不总是那么有效,使用的剂量也受到出血危险的限制。再者,某些病人合并血小板减少症和血栓症也关系到肝素治疗。这些临床所见激励着人们对肝素相关成份的兴趣,据报导,这些肝素相关成份占有较高抗血栓效力同时引起出血的危险性小,从而推测可以增加“治疗窗口”(13—15)。SJAMP是一种从海生黄瓜(刺参类)提取的肝素样酸性粘多糖,近年来作为一种潜在的抗凝药物研究(16)。据文献报导,SJAMP对凝血的影响是由于其对凝血酶活性的抑制,但其确切的抗凝机理及其抗凝作用的辅因子依从关系尚不甚清楚。

在论文的第四章里,作者介绍了SJAMP对血浆凝血酶生成影响的研究。结果显示,在血小板缺少血浆体系中,SJAMP对外源凝血途径的影响主要是抑制最大量凝血酶生成和加速凝血酶衰变。这两种现象都可归因于SJAMP依赖的抗凝血酶活性增加。SJAMP依赖的凝血酶衰变的第二序列比速率常数为 $1.5/\text{min}^{-1}/\mu\text{g/ml}$ 。这表示SJAMP对凝血酶活性的抑制效力比国际标准肝素低大约16倍。与肝素相同,SJAMP未显示对血浆外源凝血途径中凝血酶原酶活性有抑制作用。当研究SJAMP对内源凝血途径的影响时,附带的作用被观察到:SJAMP增加凝血酶生成过程中的延迟时间。这个现象可解释为由凝血酶诱导的因子Ⅲ反馈活化受到抑制。早期研究提示,凝血酶生成过程中的延迟时间代表着因子Ⅲ被凝血酶激活所需时间(17)。但是,在内源凝血途径中,SJAMP显示以剂量依赖方式刺激凝血酶原酶活性的生成,对此,尚没有适当的解释。

以微量凝血活酶触发富含血小板血浆的凝血酶生成被认为是凝血活酶和血小板协同作用的结果,这个实验体系显然要比“经典的体外凝血体系”更接近于体内状态。在相对高浓度的SJAMP存在下,SJAMP抑制最大量凝血酶的生成和增加凝血酶生成过程中的延迟

时间。结果提示,与肝素相反(18),S J A M P对凝血酶的抑制作用不易被血小板因子4中和。但是,在相对低浓度的S J A M P存在下,S J A M P显示对凝血酶生成有轻度刺激,这种效应可能与S J A M P诱导血小板聚集作用有关(16)。结论认为,在富含血小板血浆中,S J A M P的主要作用也是对凝血酶生成的抑制。

肝素及其同系物提高血浆抑制剂对凝血丝氨酸蛋白水解酶的作用,在很大程度上取决于它们与肝素辅因子的结合,即抗凝血酶Ⅲ和肝素辅因子Ⅱ(19—22)。依赖抗凝血酶Ⅲ的凝血酶抑制被认为是肝素最主要的抗凝机制(19—24),但肝素的部分抗凝血作用不依赖抗凝血酶Ⅲ的可能性也见于文献(25、26)。早期研究报导,S J A M P作为抗凝剂对凝血酶的灭活不依赖抗凝血酶Ⅲ(16)。

在论文的第五章里,作者介绍了S J A M P对凝血酶抑制作用的辅因子依从关系的研究。结果显示,在纯化的体系和抑制剂去除的血浆体系(优球蛋白成分)中,S J A M P对凝血酶活性的抑制仅见于这些实验体系用纯化的人抗凝血酶Ⅲ重组后。而在抗凝血酶Ⅲ缺陷血浆体系中的进一步研究显示,大约20%由S J A M P导介的凝血酶抑制不依赖于抗凝血酶Ⅲ。从而提示,在S J A M P导介的凝血酶抑制中有其它血浆抑制剂参与,可能是肝素辅因子Ⅱ。

基于抗凝血酶Ⅲ与S J A M P反应后内源萤光变化的直接结合实验研究提示,S J A M P对抗凝血酶Ⅲ亲合性较低,部分原因可能解释为S J A M P与肝素相比抗凝效力较低。S J A M P抗凝血酶Ⅲ结合强度与S J A M P实际抗凝活性之间的矛盾涉及S J A M P与其它浆抑制剂反应。结论认为,S J A M P对凝血酶的抑制主要通过抗凝血酶Ⅲ依赖途径,但是,不能忽视其它血浆抑制剂(如肝素辅因子Ⅱ)对S J A M P抑制凝血酶所起的作用。



## SUMMARY

The central theme in this thesis is the generation and inhibition of thrombin in plasma. The first part of the thesis presents our studies on thrombin generation in plasma of patients with congenital clotting factor deficiencies and of patients with an acquired reduction in the effective activity of the vitamin K-dependent clotting factors brought about by oral administration of vitamin K antagonists. The second part presents our studies on the influence of a heparin-like material isolated from *Stichopus japonicus selenka* (a sea cucumber) on thrombin inhibition in plasma.

Chapter I gives a general introduction in the topics that will be discussed in more detail in the following chapters.

In chapter II the importance of factor IX activation during thromboplastin-dependent coagulation in plasma (The Jossa Pathway) and thus the question "Why do haemophiliacs bleed?" is investigated. Although numerous studies have postulated that the factor IX activation in thromboplastin-dependent coagulation in plasma is of physiological importance, attention was mostly focussed on factor X activation. Convincing evidence on the generation of thrombin activity via thromboplastin-induced factor IX activation is lacking, however. Therefore, experiments were carried out in plasma of patients with a congenital deficiency of the clotting factors IX and VIII before and after reconstitution of the plasma with purified factor IX and VIII. The generation of thrombin activity in these systems is measured after triggering coagulation with diluted,  $\text{CaCl}_2$ -containing thromboplastin solutions. It is shown that in factor IX deficient plasma the generation of thrombin activity is independent of the amount of factor IX present when the plasma coagulation is triggered with the thromboplastin concentration normally used in routine tests. When, however, plasma coagulation is triggered with low concentrations of thromboplastin, a clear dependency of the generation of thrombin activity on the concentration of factor IX becomes evident at factor IX concentrations lower than 30 nM (about 40% clotting factor activity). Factor VIII seems to be a compulsory cofactor for factor IX activity, because the generation of thrombin

activity at optimal factor IX concentration is still dependent upon the amount of factor VIII present. This factor IX dependency of thromboplastin dependent coagulation probably explains why haemophiliacs bleed.

Chapter III deals with thrombin generation in dicoumarol plasma. The hypocoagulability of dicoumarol plasma is due to the combined diminution of the effective activity of the vitamin K-dependent clotting factors brought about by oral administration of a coumarin congener. The relative contribution of the individual vitamin K-dependent clotting factors to this hypocoagulability of plasma is not yet clearly understood, however. The studies presented show that addition of purified factors VII, IX or X to plasma from deeply anticoagulated patients does not influence the prothrombinase formation and the amount of thrombin formed. Only the prothrombin level in dicoumarol plasma determines the course of thrombin generation. Subsequent experiments, in which increasing amounts of the purified factors II, VII, IX or X are added to plasma deficient in respectively the factors II, VII, IX or X, show that the prothrombinase activity linearly increases with the concentration of factor II and that the concentration below which the factors VII, IX and X start to have an appreciable effect on prothrombinase activity are 5%, 20% and 40%, respectively. The half maximal amount of prothrombinase activity is found at about 1% for factor VII, 5% for factor IX and 10% for factor X. From this study it can be concluded that in dicoumarol plasma only the changes in the prothrombin level determine the antithrombotic effect. Therefore, it seems logical that, for the control of oral anticoagulant therapy, tests that reflect the prothrombin activity would be suitable.

In chapter IV the anticoagulant effect of *Stichopus japonicus* acid mucopolysaccharide (SJAMP), a heparin-like material isolated from the sea cucumber *Stichopus japonicus* selenka, is described. SJAMP has recently been studied as a potential anticoagulant drug. The effect of SJAMP on blood coagulation has been reported to be due to inhibition of thrombin activity, but the precise mechanism of its anticoagulant activity and its cofactor dependency were not yet known. The studies presented show that the main effect of SJAMP is the inhibition of thrombin activity in both platelet poor and platelet rich plasmas. On a weight basis the effect of SJAMP towards thrombin is about sixteen-fold weaker than that of the 4th international standard heparin. When experiments are carried out in

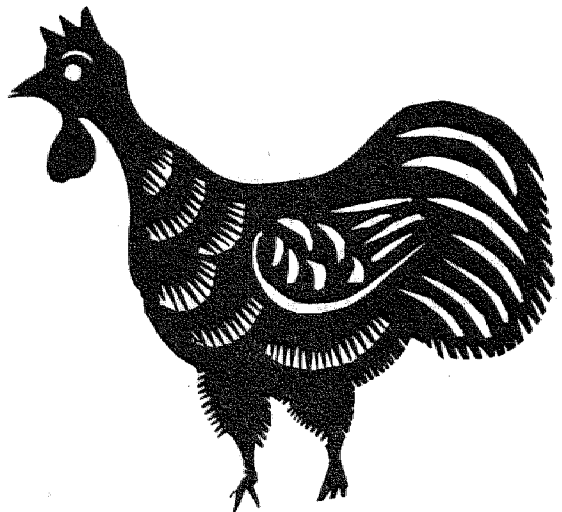
platelet poor plasma after triggering coagulation with thromboplastin, SJAMP induces both a reduction of the maximal amount of thrombin formed and an acceleration of thrombin decay. An additional effect of SJAMP is observed when coagulation in platelet poor plasma is triggered with Cephaloplastin. In this system SJAMP increases the lag time in the thrombin generation process. This effect of SJAMP can be explained by an inhibition of the feedback activation of factor VIII by thrombin. When the effect of SJAMP is studied in platelet rich plasma after triggering coagulation with trace amounts of thromboplastin a slight stimulation of the thrombin generation is observed at a low SJAMP concentration while at higher SJAMP concentrations a reduction of the maximal amount of thrombin formed and an increase in the lag time of the thrombin generation process are observed. This indicates that the inhibitory effect of SJAMP on thrombin activity, unlike that of heparin, can not be neutralized by platelet factor 4 released from activated platelets. Also in this experimental system the increase in the lag time of the thrombin generation process may be explained by an inhibition of the feedback activation of factor VIII and of the thrombin-induced platelet stimulation.

Chapter V describes the cofactor dependency of SJAMP. The enhancing effect of heparin and its analogues on the inhibition of the coagulation serine proteases by plasma inhibitors has been shown to depend largely on the ability of these compounds to bind to the heparin cofactors, i.e. antithrombin III and heparin cofactor II. Similarly, the studies presented in this chapter show that in a purified system, as well as in an inhibitor-depleted plasma (euglobulin fraction) the thrombin inhibition by SJAMP is dependent upon the presence of antithrombin III. When, however, the effect of SJAMP on thrombin inhibition is studied in an antithrombin III-depleted plasma, it is shown that in the absence of antithrombin III the thrombin inhibition is about 20% of that found after reconstitution of the plasma with purified antithrombin III. This points to the involvement of other plasma cofactors in the SJAMP-mediated thrombin inhibition.

Direct binding studies, based on the change in the intrinsic fluorescence of antithrombin III upon interaction with SJAMP, indicate that SJAMP has a relatively low affinity for antithrombin III; this low affinity is not reflected in its anticoagulant efficiency, however. The discrepancy between the SJAMP-antithrombin III binding and the anticoagulant efficiency



of SJAMP may be caused by the interaction of SJAMP with other protein cofactors such as heparin cofactor II.



## SAMENVATTING

Het centrale thema in dit proefschrift is de vorming en remming van thrombine in plasma. Het eerste deel beschrijft ons onderzoek naar de thrombine generatie in plasma's van patiënten met congenitale stollingsfaktor deficiënties en van patiënten met een verkregen reductie in de effectieve aktiviteit van vitamine K afhankelijke stollingsfactoren ten gevolge van orale toediening van vitamine K antagonisten. Het tweede deel beschrijft ons onderzoek naar de thrombine remming door een heparineachtig product geïsoleerd uit *Stichopus japonicus selenka* (een zeekomkommer).

In hoofdstuk I wordt een algemene inleiding gegeven op de onderwerpen die in de volgende hoofdstukken meer in detail zullen worden bediscussieerd.

In hoofdstuk II wordt het belang van faktor IX aktivatie in thromboplastine-afhankelijke stolling in plasma (de Josso pathway) en dus de vraag "Waarom bloeden haemofielen?" onderzocht. In vele onderzoeken is gepostuleerd dat faktor IX aktivatie in de thromboplastine afhankelijke stolling in plasma fysiologisch belangrijk is maar de aandacht was hierbij voornamelijk gericht op faktor X aktivatie in gezuiverde systemen; een duidelijk bewijs voor de generatie van thrombine aktiviteit via thromboplastine geïnduceerde faktor IX aktivatie in plasma is nog niet beschreven. Daarom werden experimenten opgezet in plasma's van patiënten met congenitale deficiënties van de stollingsfactoren VIII en IX voor en na reconstructie van de plasmas met de gezuiverde stollingsfactoren IX en VIII. De generatie van thrombine aktiviteit in deze systemen werd gemeten na initiatie van de stolling met verdunde,  $\text{CaCl}_2$ , bevattende, thromboplastine oplossingen. De experimenten met faktor IX deficiënt plasma laten zien dat, als de stolling wordt geïnitieerd met de thromboplastine concentratie die wordt gebruikt in routine tests, de generatie van de thrombine aktiviteit onafhankelijk van de hoeveelheid faktor IX is. Wanneer echter de stolling wordt geïnitieerd met lage thromboplastine concentraties wordt, bij faktor IX concentraties lager dan 30 nM (= ongeveer 40% stollingsfaktor aktiviteit) de generatie van de thrombine aktiviteit afhankelijk van de faktor IX concentratie.

Faktor VIII lijkt een essentiële cofaktor voor faktor IX aktiviteit want de

generatie van thrombine aktiviteit bij een optimale faktor IX concentratie is nog steeds afhankelijk van de aanwezige hoeveelheid faktor VIII. Deze invloed van faktor IX in de thromboplastine afhankelijke stolling kan verklaren waarom haemofielen bloeden.

In hoofdstuk III wordt de thrombine generatie in het plasma van oraal geantistolde patiënten beschreven. De hypocoagulabiliteit van dicoumarol plasma komt tot stand door een gekombineerde afname in de effectieve aktiviteit van de vitamine K afhankelijke stollingsfactoren onder invloed van orale anticoagulantia. De relatieve bijdrage van de individuele vitamine K afhankelijke stollings factoren aan de hypocoagulabiliteit van plasma is nog niet geheel opgehelderd. Het onderzoek laat zien dat toevoeging van de gezuiverde stollingsfactoren VII, IX en X aan plasma van diep geantistolde patiënten geen invloed heeft op de hoeveelheid prothrombinase en de daardoor gevormde hoeveelheid thrombine; alleen de hoeveelheid prothrombine in dicoumarol plasma bepaalt het verloop van de thrombine generatie. Experimenten waarin toenemende hoeveelheden van de gezuiverde factoren II, VII, IX of X werden toegevoegd aan plasma's deficiënt in respectievelijk de factoren II, VII, IX of X laten zien dat de prothrombinase aktiviteit lineair toeneemt met de faktor II concentratie en dat de concentraties waar beneden de factoren VII, IX en X een aanzienlijke invloed op de prothrombinase aktiviteit gaan hebben respectievelijk 5%, 20% en 40% zijn.

De halfmaximale prothrombinase aktiviteit wordt gevonden bij ongeveer 1% faktor VII, 5% faktor IX en 10% faktor X. Uit deze studie kan worden gekonkludeerd dat alleen de verandering in de hoeveelheid prothrombine in dicoumarol plasma verantwoordelijk is voor het antithrombotisch effect. Daarom lijkt het logisch om voor de controle van orale antistollings-therapie een test die de prothrombine aktiviteit meet te gebruiken.

Hoofdstuk IV beschrijft de remming van de thrombine aktiviteit onder invloed van "Stichopus japonicus acid mucopolysaccharide" (SJAMP) een heparineachtig product geïsoleerd uit zeekomkommers. SJAMP is recent naar voren gebracht als een potentieel anticoagulans. Het belangrijkste effect van SJAMP op de stolling van bloed werd hierbij gesuggereerd als een remming van de bloedplaatjes aktiviteit. Het precieze mechanisme achter de antistollingsaktiviteit en de cofaktorafhankelijkheid waren echter nog niet duidelijk. Ons onderzoek laat zien dat het voornaamste effect van SJAMP,

zowel in plaatjesarm als in plaatjesrijk plasma, de remming van de thrombine aktiviteit is.

SJAMP heeft, berekend op een gewichtsbasis, een 16 maal geringer effect op thrombine dan het 4e Internationale standaard heparine. Als de experimenten worden uitgevoerd in plaatjesarm plasma en de stolling wordt geïnitieerd met thromboplastine geeft SJAMP zowel een reductie in de maximale hoeveelheid thrombine die wordt gevormd als een verhoging van de thrombine verdwijnsnelheid. Een additioneel effect van SJAMP wordt waargenomen na initiatie van de stolling in plaatjesarm plasma met cephaloplastine. SJAMP verlengt in dit systeem de latentie-tijd in het thrombine vormings proces. Dit effect van SJAMP kan worden verklaard uit een remming van de feedback aktivatie van faktor VIII door thrombine. Wanneer het effect van SJAMP wordt onderzocht in plaatjesrijk plasma wordt na het initiëren van de stolling met zeer kleine hoeveelheden thromboplastine, geringe stimulatie van de thrombinegeneratie verkregen, terwijl hogere SJAMP concentraties een reductie in de maximale hoeveelheid thrombine en een verlenging in de latentie-tijd van het thrombine generatie proces bewerkstelligen. Dit laat zien dat het remmende effect van SJAMP op de thrombine aktiviteit, in tegenstelling tot dat van heparine, niet kan worden geneutraliseerd door plaatjes faktor 4 dat vrijkomt uit geaktiveerde plaatjes. Ook in dit experimentele systeem kan de toename van de latentie-tijd van het thrombine generatie proces worden verklaard door een remming van de feedback aktivatie van faktor VIII en van de door thrombine geïnduceerde plaatjes stimulatie.

Hoofdstuk V beschrijft de cofaktor afhankelijkheid van SJAMP. Het stimulerende effect van heparine en heparineachtige stoffen op de remming van de stollings serine-proteases door plasma remmers is afhankelijk van het vermogen van deze stoffen aan heparine cofactoren zoals antithrombine III en heparine cofaktor II te binden. De resultaten in dit hoofdstuk laten zien dat in gezuiverde systemen en ook in remmer gedepleteerd plasma (euglobuline fraktie) de thrombine remming door SJAMP afhankelijk is van de aanwezigheid van antithrombine III. Wanneer echter het effect van SJAMP op de thrombine remming wordt bepaald in antithrombine III gedepleteerd plasma blijkt ongeveer 20% van de remming onafhankelijk van antithrombine III. Dit wijst op een bijdrage van andere cofactoren dan antithrombine III aan het thrombine remmende van SJAMP.

Direkte binding studies, gebaseerd op de verandering in de intrinsieke fluorescentie van antithrombine III bij interactie met SJAMP, laten zien dat SJAMP een relatief lage affiniteit voor antithrombine III heeft. Deze lage affiniteit wordt echter niet weerspiegeld in de antistollings efficiëntie. Deze discrepantie tussen SJAMP-antithrombine III binding en de antistollings efficiëntie van SJAMP worden mogelijkwerwijs veroorzaakt door de interactie voor SJAMP met andere eiwit cofactoren zoals heparine cofactor II.

